

李晓娟,李兴杰,侯俊,等. BALB/c 突变卷毛小鼠皮肤创伤愈合对比分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(7): 42-46.
Li XJ, Li XJ, Hou J, et al. Impaired skin wound healing in BALB/c mutant curly mouse [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(7): 42-46.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 07. 007

BALB/c 突变卷毛小鼠皮肤创伤愈合对比分析

李晓娟^{1,2#}, 李兴杰^{1#}, 侯俊¹, 孙慧伟¹, 冯帆³, 王志杰¹, 李润¹, 李瑞生^{1*}

(1.中国人民解放军总医院第五医学中心临床研究管理中心,北京 100039; 2.解放军医学院,北京 100853;
3.中国人民解放军总医院第五医学中心临床检验诊疗中心,北京 100039)

【摘要】 目的 探讨 BALB/c 突变卷毛小鼠在皮肤损伤自然愈合过程中与对照 BALB/c 小鼠存在的差异。
方法 选择 6 周龄 BALB/c 突变卷毛小鼠和对照 BALB/c 小鼠各 10 只,于小鼠背部做 2 个直径为 0.5 cm 的圆形皮肤全层创口,备皮肤损伤模型,于损伤后第 3, 7, 10, 14 天观察皮肤外形愈合情况,测量皮肤损伤面积的变化及计算伤口愈合率;同时于损伤后第 3, 7, 10, 14 天取损伤部位皮肤连带周围正常皮肤,进行 HE 染色和天狼猩红染色,以观察皮肤在愈合过程中的形态学变化。
结果 外观结果显示:突变卷毛小鼠在创后 3 d 和 7 d 的愈合伤口明显愈合较快。愈合率结果显示:卷毛小鼠的皮肤在创后 3 d、7 d 的愈合率显著高于对照小鼠的愈合率,具有统计学意义($P < 0.05$),而在创后 10 d 和 14 d 两组小鼠的愈合率不具有显著差异。病理结果显示:突变卷毛小鼠在创后 3 d 创面胶原纤维明显增多,可见少量炎症细胞浸润,毛细血管扩张充血,创后 7 d 胶原增长迅速,肉芽组织显著增多,可见部分表皮再生生长。天狼猩红染色结果显示:卷毛小鼠在创后 3 d 至 14 d 可以清晰的看到胶原纤维和肉芽组织从底层逐渐顶替修复破损部位,直至表皮和毛囊生长出来。
结论 BALB/c 突变卷毛小鼠皮肤创伤后前期的愈合能力强于对照小鼠,为今后该突变小鼠应用于皮肤创伤愈合模型研究提供了理论参考。

【关键词】 BALB/c 小鼠;突变卷毛;皮肤愈合

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 07-0042-05

Impaired skin wound healing in BALB/c mutant curly mouse

LI Xiaojuan^{1, 2#}, LI Xingjie^{1#}, HOU Jun¹, SUN Huiwei¹, FENG Fan³, WANG Zhijie¹, LI Run¹, LI Ruisheng^{1*}

(1. Research Center for Clinical and Translational Medicine, Fifth Medical Center, General Hospital of PLA, Beijing 100039, China. 2. Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853. 3. Clinical Examination and Treatment Center, Fifth Medical Center, General Hospital of PLA, Beijing 100039)

【Abstract】 **Objective** To investigate the difference between BALB/c mutant curly mice and control BALB/c mice in terms of natural healing of skin injuries. **Methods** Ten 6-week-old BALB/c mutant curly mice and 10 control BALB/c mice were selected. Two full-thickness skin wounds with a diameter of 0.5 cm were created on the back of the mice. A skin injury model was used. Skin healing was observed at 3, 7, 10, and 14 days after injury, and changes in the skin damage area and the wound healing rate were measured. Animals were sacrificed at 3, 7, 10, and 14 days after injury. HE staining and Sirius staining were performed to observe pathological changes in the skin during healing. **Results** The skin wounds healed faster in the mutant curly mice at 3 and 7 days after wound healing. The skin wound healing rate of the

【基金项目】 军队实验动物专项基金面上项目(SYDW(2016)-005)。

【作者简介】 李晓娟(1980—),女,硕士。E-mail: sxlily55@163.com

李兴杰(1988—),男,技师。E-mail: 710988681@qq.com #共同第一作者

【通信作者】 李瑞生(1969—),男,博士,副研究员,主要从事实验动物模型研究。E-mail: lrsheng@sohu.com

curly mice at 3 and 7 days after injury was significantly higher than that of the control mice ($P < 0.05$), but there was no significant difference between the two groups at 10 and 14 days after injury. The pathological examination showed that the collagen fibers of the mutant curly haired mice increased significantly 3 days after injury, and there was a small amount of inflammatory cell infiltration, and capillary dilation and congestion. Collagen grew rapidly 7 days after injury, levels of granulation tissue increased significantly, and some epidermis regenerated and grew. The Sirius scarlet staining result showed that collagen fibers and granulation tissue were present from the bottom layer of the injury, to repair the damaged area, until the epidermis and hair follicles grew out from 3 to 14 days in the curly-haired mice. **Conclusions** BALB/c mutant curly mice have better healing ability than control mice in the early stage of skin trauma, which provides a theoretical reference for the application of BALB/c mutant mice in skin wound healing models in the future.

【Keywords】 BALB/c mouse; mutant curly; skin healing

皮肤是哺乳动物最大的器官,具有屏障、吸收、代谢免疫调节等多种生理功能,其完整性及稳态直接关系到机体的健康状态^[1]。皮肤创伤愈合一直是研究的热点和难点,由于皮肤的创伤愈合是一个复杂的病理过程,包括炎症反应、细胞增殖、血管生成、基质沉积和皮肤重塑等方面^[2-3]。而我们在前期的研究中发现突变卷毛对小鼠的皮肤外观和毛囊结构有一定的影响,与正常小鼠存在着一定差异^[4],因而推测突变卷毛基因可能对皮肤创伤愈合也可能有所影响。本实验对 BALB/c 突变卷毛小鼠与对照 BALB/c 小鼠的皮肤创伤愈合能力进行了比较分析,以了解突变小鼠的皮肤与对照小鼠皮肤应对创伤的修复能力是否存在差异,探讨这种差异对皮肤修复起到促进或抑制的作用,为今后研究卷毛小鼠突变基因的作用以及为本突变小鼠成为皮肤创伤修复研究模型的可能提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选择 SPF 级 6 周龄 BALB/c 突变卷毛小鼠 10 只,雌性,18~20 g,来源于本实验室近交培育(全同胞兄妹交配);选择 SPF 级 6 周龄 BALB/c 小鼠 10 只,雌性,18~20 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2016-0002]。饲养室[SYXK(军)2017-0016]温度 22℃~25℃,环境湿度 40%,自由进食和饮水,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。本实验通过了解放军总医院第五医学中心动物伦理委员会审查,项目伦理审查批准号:IACUC-2017-006。

1.2 主要试剂与仪器

甲醛(批号:1210122,西陇化工股份有限公司);生理盐水(批号:130520405,石家庄四药有限公司);异氟烷(批号:217172201,深圳市瑞沃德生

命科技有限公司);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司;天狼猩红染料自行配置;石蜡切片机(美国 AO),正置显微镜(日本 NIKON)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠皮肤创面模型制备

本实验分为 2 组:突变小鼠组(10 只)和对照(正常)小鼠组(10 只)。将两组小鼠分别经异氟烷麻醉,剃去背部毛,碘伏局部消毒,以脊柱为中线,用无菌眼科剪在小鼠背部切除全层皮肤,形成两个直径约 0.5 cm 皮肤全层损伤创面,深及筋膜,无菌纱布止血。造模成功后拍照记录,放回鼠笼单笼饲养,自由饮食。

1.3.2 小鼠创口愈合的观察指标

皮肤创伤模型建立后,观察创口外观的变化情况,创缘上皮化和局部肉芽组织的颜色及形态。同时根据张凯等方法^[5],分别在创伤后第 3、7、10、14 天透明硫酸纸覆盖于创口表面,沿创口外缘画线,用正交坐标纸测量创口面积,计算愈合率,愈合率=(1-切口面积/原切口面积)×100%。

1.3.3 小鼠皮肤组织病理学检测

在术后第 3、7、10、14 天测量完愈合创口面积后,从两组中随机分别取 2 只小鼠,麻醉后取创面新生皮肤组织及周围少许正常皮肤,用 4% 多聚甲醛固定,将固定好的组织脱水、包埋、切片,进行 HE 染色和天狼猩红染色,显微镜下观察不同阶段新生皮肤病理学改变,拍照分析。

1.4 统计学方法

实验数据均采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 19.0 统计学软件对各项指标数据进行正态性检验,应用配对 t 检验对实验结果进行性别及组间分析比较。以 $P < 0.05$ 及 $P < 0.01$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 两组小鼠创面愈合皮肤外观对比分析

肉眼观察显示,两组小鼠的两个创面恢复都存在先后现象。而卷毛小鼠创后 3 d 可观察到由少量的稠液渗出量,创面呈向心性生长,有明显的结痂覆盖(见图 1B),创后 7 d 皮肤创缘出现了上皮化现象(见图 1C),创后 10 d 创面持续减少,可见清晰的较小的愈合面(见图 1D),创后 14 d 可见创面已愈合,完全上皮化,愈合面几乎肉眼看不清(见图 1E);而对照组小鼠在创后 3 d 稠液渗出量较多,创面仅出现较小的缩小,有炎症反应发生(见图 1G),创后 7 d 皮肤创面渗出液减少,伤口周围干燥出现结痂(见图 1H),创后 10 d 创面出现大面积的愈合(见图 1I),创后 14 d 创面愈合,出现上皮化,愈合后的疤痕清晰可见(见图 1J)。对照小鼠愈合速度慢于卷毛小鼠。

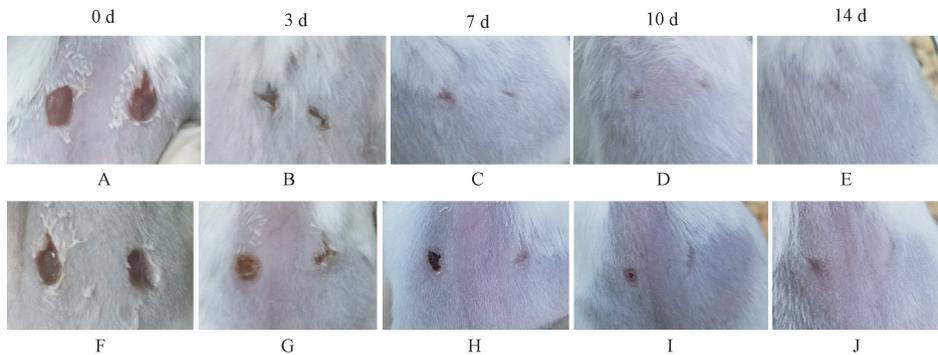
2.2 两组小鼠创伤愈合率及创面愈合时间对比分析

根据前述公式计算皮肤愈合率结果显示:卷毛小鼠的皮肤在创后 3 d、7 d 的愈合率显著高于对照

小鼠的愈合率,具有统计学意义($P < 0.05$)。而在创后 10 d 和 14 d 两组小鼠的愈合率不具有显著差异。(见表 1)

2.3 两组小鼠创伤愈合过程中皮肤形态学改变对比分析

HE 染色结果显示:皮肤创后 3 d:卷毛小鼠的创面胶原纤维明显增多,可见少量炎症细胞浸润,毛细血管扩张充血,而对照小鼠创后 3 d 的创面炎症细胞浸润多于卷毛小鼠,胶原纤维增多的程度少于卷毛小鼠(见图 2A 和 2E);创后 7 d:卷毛小鼠的胶原增长迅速,炎症细胞浸润继续增多,肉芽组织显著增多,可见部分表皮再生生长,对照小鼠的损伤部位仍只能看到胶原增厚,修复痕迹还不明显(见图 2B 和 2F);创后 10 d:卷毛小鼠的胶原修复基本完成,肉芽组织几乎将破损处填平,创面上皮基本上皮化,而且能看到新生的毛囊,而对照小鼠的破损修复也基本完成,但是还没有毛囊的新生(见图 2C 和 2G)。创后 14 d:卷毛小鼠新生皮肤中毛囊已经有毛发生长,对照小鼠的皮肤中还未看到毛发生长(见图 2D 和 2H)。



注:A~E:依次为卷毛小鼠 0, 3, 7, 10 d 和 14 d;F~J:依次为对照小鼠 0, 3, 7, 10 d 和 14 d。

图 1 两组小鼠外观特征的对比

Note. A-E, Curly mice at 0, 3, 7, 10 d and 14 d, respectively. F-J, Control mice at 0, 3, 7, 10 d and 14 d, respectively.

Figure 1 Comparison between the appearance of the mice in the two groups

表 1 两组小鼠不同时间点创面愈合率比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Comparison of wound healing rates at different time points in the two groups

组别 Groups	愈合率(%) Healing rate(%)			
	3 d	7 d	10 d	14 d
卷毛小鼠 Curly mice	65.23±2.45*	82.14±3.10*	90.25±2.98	98.32±1.10
对照小鼠 Control mice	36.02±1.67	62.37±1.24	82.74±1.54	93.78±0.98

注:与对照小鼠比较,* $P < 0.05$ 。

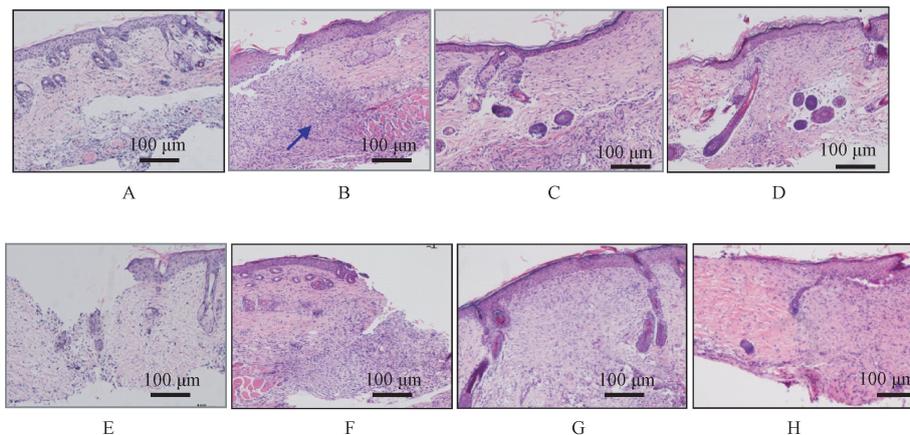
Note. Compared with the control mice, * $P < 0.05$.

天狼猩红染色结果显示:根据文献^[6],I 型胶原染成粉红色,可观察到胶原和肉芽组织染为淡粉红色。表皮、毛囊和毛发染为黄色。卷毛小鼠在创后 3 ~ 14 d 可以清晰的看到胶原纤维和肉芽组织从底层逐渐顶替修复破损部位,直至表皮和毛囊生长出来。而对照小鼠的修复过程与卷毛小鼠相似,但恢复时间较慢(见图 3)。

3 讨论

皮肤作为与外界接触的屏障,在创伤愈合中起

非常重要的作用^[7]。皮肤创伤愈合不仅是一个复杂的病理过程,更是一个高度复杂的生物过程,由炎症、增殖和重塑三个重叠的阶段组成^[8]。任何一个或多个阶段的损伤以及年龄等因素都会导致皮肤的修复过程的障碍和改变^[9-10],因此皮肤创伤愈合一直是医学界的一个难题。王海涛^[11]等探讨了皮肤创伤修复过程中皮肤干细胞的分布以及增殖分化迁移特征。伍小敏^[12]等研究发现罗哌卡因可以促进小鼠全层皮肤损伤愈合以及能够促进 GM-CSF 表达在皮肤愈合中发挥的作用。Ding 等^[13]研

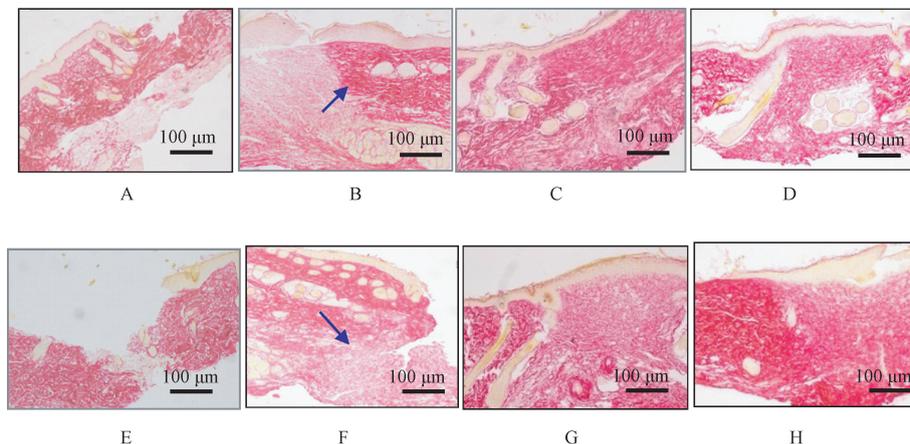


注:A~D:依次为卷毛小鼠 3, 7, 10 d 和 14 d;E~H:依次为对照小鼠 3, 7, 10 d 和 14 d。蓝色箭头可见炎症细胞。

图 2 两组小鼠皮肤组织病理学观察(HE 染色,× 200)

Note. A-D, Curly mice at 3, 7, 10 d and 14 d, respectively. E-H, Control mice at 3, 7, 10 d and 14 d, respectively. The blue arrow shows inflammatory cells.

Figure 2 The skin histopathology of mice in the two groups. HE staining



注:A~D:依次为卷毛小鼠 3, 7, 10 d 和 14 d;E~H:依次为对照小鼠 3, 7, 10 d 和 14 d。蓝色箭头可见胶原修复处。

图 3 两组小鼠皮肤组织病理学观察(天狼猩红染色,× 200)

Note. A-D, Curly mice at 3, 7, 10 d and 14 d, respectively. E-H, Control mice at 3, 7, 10 d and 14 d, respectively. The blue arrow is visible at the collagen repair.

Figure 3 The skin histopathology of mice in the two groups. Sirius red staining

究发现富含血小板的纤维蛋白可以通过增加血管的形成来加速糖尿病小鼠模型的皮肤伤口愈合。国内外许多研究者对皮肤创伤愈合均进行了探讨和研究,但对皮肤愈合机制尚未有定论,同时对于基因突变小鼠的皮肤创伤愈合尚未见报道。

本实验对 BALB/c 突变卷毛小鼠与对照 BALB/c 小鼠的皮肤创伤愈合能力进行了比较分析:从创口愈合的外观结果显示卷毛小鼠在创伤后的 3~7 d 为愈合急速期,愈合能力显著强于对照小鼠,而在愈合后期 10~14 d,两组的愈合速度及愈合率相差不多。同时我们从两组小鼠测量创口计算的愈合率结果也能看出:卷毛小鼠的皮肤在创后 3 d 和 7 d 的愈合率显著高于对照小鼠的愈合率,具有统计学意义($P < 0.05$),而在创后 10 d 和 14 d 两组小鼠的愈合率不具有显著性差异。病理分析结果显示:皮肤创后 3 d 时卷毛小鼠的创面胶原纤维明显增多,炎症细胞浸润较少,毛细血管扩张充血,对照小鼠的创面炎症细胞浸润多于卷毛小鼠,胶原纤维增多的程度少于卷毛小鼠,与外观结果相符合。创伤愈合的起始阶段为炎症反应,主要包括中性粒细胞和巨噬细胞的浸润以及炎症因子的分泌^[14]。随后进入增殖阶段,首先是肉芽组织的增生,肉芽组织在组织损伤后 2~3 d 内即可出现^[15]。病理结果也显示卷毛小鼠 3 d 和 7 d 的肉芽组织生长极其旺盛,因此对皮肤愈合起到关键的推动作用。天狼猩红染色结果能够更好的显示胶原修复的过程,其结果与 HE 染色结果相同,进一步印证了卷毛小鼠在创伤修复前期的修复能力强于对照小鼠。卷毛小鼠前期皮肤修复机制有待进一步深入研究。

综上所述, BALB/c 突变卷毛小鼠在皮肤创伤前期的愈合修复能力显著强于对照 BALB/c 小鼠,因此我们可以推断该突变基因不仅对该突变小鼠的皮肤组织和毛囊的发育周期产生了影响^[16],而且对皮肤创伤愈合能力也产生了促进作用,此结果为我们进一步研究突变基因对皮肤的影响提供了理论基础,同时也为 BALB/c 突变卷毛小鼠模型应用于皮肤创伤修复模型以及研究皮肤创伤愈合机制奠定了理论平台。

参考文献:

[1] 楼敏铭,王宏伟,马洁.脐带间充质干细胞条件培养液联合透

明质酸修复小鼠皮肤损伤[J].中国组织工程研究,2018,22(1):20-25.

- [2] Wang PH, Huang BS, Yeh CC, et al. Wound healing[J]. J Chin Med Assoc, 2018, 81(2): 94-101.
- [3] 朱婷,冯玉,肖静,等.三七皂苷 R1 不同给药方式对皮肤创伤愈合作用的影响[J].中国药理学通报,2018,34(3):325-330.
- [4] 李晓娟,李硕,白冰珂,等. BALB/c 突变卷毛小鼠皮肤组织结构的分析[J].中国比较医学杂志,2014,24(4):47-50.
- [5] 张凯,司艺玲,林季,等.瘦素及其抗体对小鼠皮肤创伤的修复作用[J].标记免疫分析与临床,2008,15(4):231.
- [6] 刘亚敏,张诗武,魏焕萍.免疫组织化学和天狼猩红双重染色技术在病理诊断中的应用[J].武警医学院学报,2004,13(3):237-238.
- [7] 张伟,刘伟江,王鹏,等.间充质干细胞培养上清对小鼠皮肤损伤修复的实验研究[J].军事医学,2018,42(3):176-181.
- [8] 赵光明,董建勋,李媛,等.回阳生肌方药对糖尿病皮肤溃疡大鼠创面愈合的影响[J].北京中医药大学学报,2014,37(7):495-499,后插2-后插3.
- [9] Hong WX, Hu MS, Esquivel M, et al. The role of hypoxia-inducible factor in wound healing[J]. Adv Wound Care (New Rochelle), 2014, 3(5): 390-399.
- [10] Yanai H, Lumenta DB, Vierlinger K, et al. Middle age has a significant impact on gene expression during skin wound healing in male mice[J]. Biogerontology, 2016, 17(4): 763-770.
- [11] 王海涛,朱梓赫,李树伟,等.皮肤创伤愈合过程中短暂扩增细胞增生及皮肤干细胞迁移[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2016,25(4):328-334.
- [12] 伍小敏,蔡放,王宏法,等.罗哌卡因对皮肤损伤愈合及 GM-CSF 表达的影响[J].中国现代医学杂志,2017,27(6):23-26.
- [13] Ding Y, Cui L, Zhao Q, et al. Platelet-rich fibrin accelerates skin wound healing in diabetic mice[J]. Ann Plast Surg, 2017, 79(3): e15-e19.
- [14] 丁越,张辉,孙晓菊.骨髓间充质干细胞促进皮肤创伤愈合及细胞因子在愈合过程表达研究[J].中国实用口腔科杂志,2015,8(2):103-107.
- [15] Greaves NS, Ashcroft KJ, Baguneid M, et al. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing [J]. J Dermatol Sci, 2013, 72(3): 206-217.
- [16] 李晓娟,李硕,白冰珂,等. BALB/c 突变卷毛小鼠皮肤组织结构的分析[J].中国比较医学杂志,2014,24(4):47-50.

[收稿日期]2019-03-21